

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07846

研究課題名(和文) 亜熱帯常緑広葉樹の結実誘導に必要な繁殖資源の閾値の解明

研究課題名(英文) Analysis of threshold of breeding resources necessary for fruit induction of subtropical evergreen broad-leaved trees

研究代表者

谷口 真吾 (Taniguchi, Shingo)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：80444909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉の光合成器官(ソース)で得られた繁殖資源の光合成産物を¹³C安定同位体トレーサー法によって花や果実の繁殖器官(シンク)に資源輸送するパターン(繁殖ステージ別にどのソースからシンクに転流したのか)とそのしくみの解明を操作実験で試みた。その結果、豊作年は「結実当年の光合成産物」を主に消費し、並作、凶作年は「結実前年の枝に貯蔵された炭水化物をまず消費後に結実当年の光合成産物を消費する」ことが判明した。しかしながら、豊作年の翌年に訪れる結実の並～凶作現象は豊作年の多量の果実生産がシンクとなり炭素・窒素を集積し、樹体内の炭素・窒素不足が翌年の花芽分化を阻害する実験仮説に関しては明瞭に把握できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜熱帯常緑広葉樹の光合成産物(炭水化物)を安定同位体の標識法を用いて生理的な観点から繁殖資源の配分特性を把握した本研究の成果は、果実の豊凶現象の発生に対する至近要因ならびに究極要因の新たな解釈と豊凶現象の発生メカニズムの解明につながる基礎知見となることが期待される。本研究は¹³C安定同位体の標識法により繁殖ステージごとに繁殖資源の供給源と配分先を判明することができた。これらの結果をもとに、結実の豊凶現象の発生メカニズムと周期性に関する議論をさらに発展させることになり、学術的な意義は高い。しかし、炭素と窒素を多量に集積した翌年に樹体内の炭素・窒素不足が花芽分化を阻害する現象の解明はできなかった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the pattern of transport of photosynthetic products of reproductive resources obtained in photosynthetic organs (sources) of leaves to reproductive organs (sinks) of flowers and fruits by ¹³C stable isotope tracer method (from which source to which sink at each reproductive stage) and its mechanism in manipulation experiments. As a result, it was found that "the photosynthate of the current year of fruiting" was mainly consumed in a good harvest year, while "carbohydrates stored in the branches in the previous year of fruiting were first consumed and then the photosynthate of the current year was consumed" in a normal or bad harvest year. However, the experimental hypothesis that a poor crop in the year following a good crop year was caused by a carbon and nitrogen deficiency in the tree body due to sinking too much carbon and nitrogen in the good crop year, which inhibited flower bud differentiation in the following year, was not clearly understood.

研究分野：森林科学

 キーワード：樹木繁殖 開花結実 豊凶周期(マスティング) ¹³C安定同位体 繁殖資源 非構造性炭水化物 リュウキュウコクタン 亜熱帯島嶼

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

樹木の生活史(成長・繁殖・生存)のうち次世代の個体を残す開花結実(繁殖)は、種の適応度が最大となるように有限の繁殖資源を配分し、受粉や種子散布が効率的に行われるように繁殖器官の数と配置、その着生周期を決定している(菊沢, 1995; 矢原, 1995)。樹木の結実の豊凶現象(マस्टィング)は古くから多くの研究者の関心と興味の対象であった。これまでに結実の豊凶現象を解明すべく様々な諸仮説が提起され、多くの樹種で検証されてきた。Janzen (1971)の捕食者飽食仮説、Kelly (1994)の気象、受粉効率に関する仮説が有名であるが、それらは豊凶現象の適応的意義の論考であり、どの仮説も結実の豊凶現象を完全に説明するまでには至っていない。最近では、Hock (2005)の「落葉樹では種子生産に関わる炭水化物は、貯蔵資源よりも結実年の光合成生産に由来する」との資源収支モデル(Isagi, 1997)に反証する報告が発表されているが、いずれも繁殖資源の配分収支の面からの議論は少なく、豊凶の発生メカニズムの十分な解明に至っていない。

樹木の繁殖は、枝の貯蔵炭水化物量(可溶性糖+デンプン; 非構造的炭水化物)と当年葉での光合成による炭水化物量をめぐる相互作用の結果であるといえる。Miyazaki *et al.* (2002)は、結実の豊作年には繁殖枝内に蓄積されたデンプン量が減少するが、非繁殖枝ではデンプンの蓄積量に変化がないことを落葉樹の操作実験で明らかにし、貯蔵資源の利用に繁殖枝のユニット間での独立性を示唆した。Han *et al.* (2008; 2010; 2011; 2013)は、落葉樹であるブナの結実は豊作年に窒素を種子に優先配分するため、翌年の花芽分化が阻害される現象を検証した。さらに結実の周期は窒素と非構造的炭水化物の体内貯蔵量に関係し、この貯蔵資源の年変化が豊作の指標に利用できることを考察した(Han *et al.*, 2013)。Ichie *et al.* (2013a; 2013b)は、放射性炭素により繁殖周期の異なる落葉樹を主体とする樹木の種子に含まれる炭素がいつ作られたかを検証し繁殖周期に関係なく樹木は当年に生産した比較的新しい炭素を種子生産に利用することを報告した。これらは、冷温帯、温帯、暖温帯、熱帯の落葉広葉樹を研究対象とした最新の研究動向である。このように、落葉広葉樹では開花結実の豊凶メカニズムと豊凶周期の至近要因を十分に説明できる基礎的で重要な知見が数多く集積されつつあるが、一方、常緑広葉樹においては、このような研究事例や研究成果が未だ数少なく、繁殖資源の配分や蓄積に関する研究が未だ十分でない(Hoch, 2005)。結実周期や種子生産などが当年以前の貯蔵資源と当年葉の光合成産物にどのくらいの比率で依存しているのかについては、常緑広葉樹ではまったく不明であり類似の研究も少ない。

2. 研究の目的

本研究は、平成24年度から26年度までの研究期間で採択された科学研究費補助金基盤研究(C)の「琉球列島に分布する有用樹木の繁殖資源の配分と安定同位体による豊凶メカニズムの解明」の研究課題において、リュウキュウコクタンの豊作年の繁殖枝への「環状剥皮+100%摘葉(葉を100%除去)」処理区では、無処理区と同じ数量、サイズの花生産、果実生産が認められ、成熟果実のサイズに差異がない現象を発見したことが本研究の着想に至った経緯である。この事実は、成熟中の果実がシンク器官として光合成産物を集積させるとする既報(e.g., Henriksson, 2001)の現象とは異なった。つまり、リュウキュウコクタンの繁殖枝への操作処理により、葉は100%除去され光合成はできない。同時に環状剥皮による師管除去で葉の光合成産物の移動はできない。使える資源は枝の貯蔵資源だけであり、本来は枯死に至る処理枝である。しかし、 ^{13}C 安定同位体トレーサー(標識)実験より、近接する無処理区から処理枝に光合成産物が転流し、環状剥皮

+ 100%摘葉区の花数、果実生産量と果実サイズは無処理区に比して統計的に差がなかった。つまり、Hock (2005) の「落葉樹の種子生産に関わる炭水化物は、貯蔵資源よりも結実年の光合成生産に由来する」を示唆する現象と考察は、本研究計画の科学的根拠でもある。しかしながら常緑広葉樹では、樹木の繁殖生理に関する十分なデータ蓄積があるとは言えない。研究代表者の繁殖資源の配分に関する研究は、主にリュウキュウコクタンを供試してきた。繁殖前年枝の柔組織の貯蔵デンプン量は開花後の幼果実形成時までに急激に減少したものの、結実の豊作年では種子生産に当年の葉の光合成産物のみを使っている現象を確認している（谷口：未発表）。さらに凶作年の幼果実期には前年枝の貯蔵炭水化物を使い、種子生産の後半、8月以降の成熟期には当年の光合成産物を使うことを確認している（谷口：未発表）。本研究は、安定同位体を用いて樹木の繁殖枝と非繁殖枝に投資される前年の貯蔵炭水化物量と当年の光合成産物量を把握し、繁殖資源が成長と種子生産にどう配分されるのかを解明する。さらに、種子生産に関わる繁殖資源の供給源を検証するため、樹体内の貯蔵された可溶性糖とデンプン量、貯蔵窒素量を経時測定した。同時に結実や種子生産の誘導に必要な樹体内の年貯蔵炭水化物量、年貯蔵窒素量の閾値を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 調査地の概況および供試体

沖縄島嶼、亜熱帯に分布の中心をもつ常緑広葉樹であり、琉球列島の在来種であるリュウキュウコクタン (*Diospyros ferrea* Bakh) を供試した (2017年現在、37年生)。林業、環境・景観緑化に有用な樹木である。調査地は沖縄県中頭郡西原町字千原1番地の琉球大学農学部構内の樹木林帯にあるリュウキュウコクタン個体群である。

(2) 操作実験の処理区の設定

供試木は樹幹への日当たりが良く葉が正常な大きさを持つ健全個体を試験地から抽出し、雌株2個体に操作実験の処理区を設定した。1個体から、直径30mm以上の枝を2本選び、そのうち1本には環状剥皮を行い、もう一方の枝には環状剥皮は行わない。供試個体に対し、0%摘葉、50%枚数摘葉、50%面積摘葉、100%摘葉の処理を行った。つまり処理区は【無剥皮+0%摘葉区、無剥皮+50%枚数摘葉区、無剥皮+50%面積摘葉区、無剥皮+100%摘葉区、剥皮+0%摘葉区、剥皮+50%枚数摘葉区、剥皮+50%面積摘葉区、剥皮+100%摘葉区】の計8処理区である。0%摘葉処理区とは摘葉処理を行わない区のこと、100%摘葉処理区とは枝についている葉をすべて摘葉した区である。50%枚数摘葉区は枝についている葉の枚数が半分になるように摘葉し、50%面積摘葉区は枝についている全ての葉1枚1枚の面積を半分に切除した。環状剥皮処理は、接ぎ木ナイフを用いて基部の外樹皮の円周80%を20mm幅で除去した。剥皮は樹皮を一部残し、木部まで深くナイフを入れて折損や腐れの原因にならないようにした。

(3) 分析する各器官の粉碎作業

炭素安定同位体分析、可溶性糖分析、NC分析に供する各器官の試料を定法に従って微粉碎した。モジュールを葉、枝、果実に分解したのち凍結乾燥により各重量を計測した。マルチピースショッカー (安井器械株式会社製 PV1001(S)) を用いて微粉碎を行った。

(4) 種子生産に関わる炭水化物の供給源の解明

13C 安定同位体のトレーサー (標識) 実験

当年の光合成産物 (炭水化物) のモジュール間の移動経路を検討するため豊作年、並作年、凶作年ごとの繁殖枝、非繁殖枝別の柔組織に貯蔵された炭水化物量 (可溶性糖 + デンプン) の時期別変動と当年葉で同化された光合成産物の果実への転流経路を 13C 安定同位体トレーサー

(標識)実験で移動経路を追跡した。トレーサー(標識)実験により種子生産の炭素源の供給は「結実当年に生産された比較的新しい光合成産物(炭水化物;可溶性糖+デンプン)」か、あるいは、「結実前年に枝もしくは樹体内の柔細胞等に貯蔵された貯蔵炭水化物(可溶性糖+デンプン)」のどちらが種子生産に貢献、寄与しているのかを解明した。本研究では果実の成熟ステージで0%摘葉区に吸収させた¹³Cが残りの3処理区(50%枚数摘葉区、50%面積摘葉区100%摘葉区)の果実、枝、葉にどれだけ転流するかを把握する実験系で行った。トレーサー(標識)実験に供した繁殖器官のサンプル採取は幼果実期の6月、果実成長期の7月と8月、成熟期の9月の計4回である。¹³C安定同位体をトレースした処理区では¹³C₀₂を9~10時間吸収させた後、チャンバーを撤去した。チャンバーを撤去した5日後、処理区からモジュールをランダムに採取し、実験室内で葉、枝、果実の分解作業を行い生重や大きさを計測した。処理後、各器官を微粉碎し同位体比質量分析計(Thermo Fisher Scientific社製EA1112-DELTA V ADVANTAGE ConFlo System (EA-IRMS))を用い、定法により質量分析(¹³Catom%)を測定した。

(5)繁殖資源の年貯蔵量の変化と豊作年の誘導に必要な年貯蔵量の閾値の解明

可溶性糖の分析

貯蔵炭水化物量(可溶性糖+デンプン)を経時測定するため定期的に個体別の繁殖器官を含む葉および非同化器官のサンプルを採取し、各器官の貯蔵炭水化物を定量分析した。粉碎作業で粉碎した葉、枝、果実の微粉碎試料0.1gが入った遠沈管に80%エタノールを3ml注入し撹拌した。80℃の恒温ウォーターバス(アズワン株式会社製TR-1AR)で30分間湯浴させた後、3000rpmで10分間、遠心分離機(HSIANGTAI社製CN-1040)にかけ、上清と残渣を得た。上清を別の遠沈管に移し、残った残渣に再び80%エタノールを注入し、同工程を2回繰り返して可溶性糖のみ抽出した。得られた溶液をHPLCオートサンプラー用のスクリューパーバイアル(ジーエルサイエンス社製)に移し、HPLC(島津製作所製LC-20AD)、カラム(島津製作所製shim-pack SCR-101N長さ:300mm内径:7.9mm粒子径:10 μ m)、ガードカラム(島津製作所製SCR-N長さ:50mm内径:4mm)を使用し分析を行った。

葉、枝、果実に含まれる炭素、窒素の分析

果実成熟における葉、枝、果実中の全窒素、全炭素量は、微粉碎したサンプルをNC元素分析装置(住化分析センター社製SUMIGRAPH NC-220F)を用いて分析した。標準試料にはDL-アスパラギン酸(キシダ化学株式会社製E45777Y)を用いた。この標準試料のNC含有率(N=10.52%、C=36.09%)から出る燃焼ガス量を上回らないように150mg~250mgのサンプルを秤量し、定法により窒素、炭素含有率を分析した。

4. 研究成果

(1)種子生産に関わる炭水化物の供給源の解明; ¹³C安定同位体トレーサー(標識)実験

繁殖モジュール(繁殖枝)当たりに着果した生産果実数が一定水準より高いと0%摘葉区(正常に光合成を行う葉のある区)で発生させた¹³C安定同位体を含む光合成産物が100%摘葉区(光合成を行う葉が100%ない区)の果実に転流した。この閾値は、繁殖モジュール(繁殖枝)当たりの果実数が2.40個以上であった(¹³Cの転流が認められた果実数:3.63個、2.82個、2.40個:豊作年と思われる)。一方、閾値として果実数が2.12個以下の低い値であると¹³C安定同位体を含む光合成産物の転流は認められなかった(¹³Cの転流が認められなかった果実数:2.12個、1.94個:並作年と思われる)。しかしながら、果実数1.65個(凶作年と思われる)の繁殖年で¹³Cの転流が認められた事例があった。この理由は、個体特性であると考えているが、果実のサイズと乾燥重量が通常個体の果実と比べてかなり高い個体であった。このことは、果

実の体積ならびに重量の大小がシンクとして機能した可能性があり、他の枝からの光合成産物を転流させたと考えられる。このため、これまでに得られた実験データはこの観点から再考する必要がある。この結果、リュウキュウコクタンでは豊作年には他の枝の光合成産物が100%摘葉した枝で生産される果実に集中（シンク機能）して転流が起こった。並作、凶作年では13Cを含む光合成産物は他の処理区に転流しなかった。果実生産数が少なかった年の光合成産物は繁殖枝で消費されたため転流は起こらない傾向がみられた。このことから、リュウキュウコクタンの豊作年では当年の光合成産物を果実生産に消費し、摘葉した繁殖枝への光合成産物の転流が起こることが明らかになった。さらに、並作年、凶作年では枝に貯蔵した光合成産物を果実の成長に費やした後に当年生の葉で生産した光合成産物を果実成熟に供することが判明した。

(2) 繁殖資源の年貯蔵量の変化と豊作年の誘導に必要な年貯蔵量の閾値の解明

可溶性糖（スクロース、グルコース、フルクトース）の分析

スクロースはすべての処理区の葉と枝で検出された。果実は、13Cの転流が確認された無剥皮区では100%摘葉、50%枚数摘葉、50%面積摘葉の果実成長期のみを検出された。同様に剥皮区では0%摘葉、50%枚数摘葉、50%面積摘葉の果実成長期のみを検出された。13Cの転流が確認された無剥皮区0%摘葉と剥皮区100%摘葉の果実にスクロースが検出されなかったのは、無剥皮区0%摘葉では合成された糖がスクロースの形で他の処理区に転流したものと推察され、さらに剥皮区100%摘葉の果実は他の枝からの光合成産物の転流分をすべて消費したことで余剰分を貯蔵することができなかったと考察した。13Cの転流が確認されなかった剥皮、無剥皮区の果実には果実成長期のみすべての処理区でスクロースが検出された。果実においてスクロースが検出される時期が果実成長期のみであったことは、幼果実期の果実成長と果実成熟期の果実成熟に消費され、果実成長期以降は消費されずに果実に蓄積、貯蔵されたと考察した。グルコースはすべての処理区で枝のみに検出された。秋以降には枝の伸長成長が停止するため、グルコースは消費されず次年度の成長あるいは繁殖の資源として枝の柔組織（柔細胞）にデンプン粒など多糖類の形に重合し、貯蔵、蓄積された可能性が示唆される。フルクトースは、すべての処理区で果実のみに検出された。果実成長期に増加する傾向があり、果糖とも呼ばれるフルクトースは果実成長期以降の果実の糖度を上昇させるため果実に蓄積された可能性が示唆された。

枝、葉、果実に含まれる全窒素量と全炭素量

全窒素の含有量は枝には少なく、葉で多かった。窒素は光合成に関与するクロロフィルaを構成する成分であることから、葉での全窒素含有量の高さは光合成活性の高さを示している。葉の窒素含有量は果実の成熟にともない時系列で減少した。常緑樹のリュウキュウコクタンは年中光合成を行うため、葉で光合成活性を維持していくためのクロロフィルa合成に窒素が消費された可能性が考えられる。枝の窒素含有量は、幼果実期に増加し果実成長期に減少する傾向であった。分析に供した枝が当年に成長した一次枝であったことから、枝の貯蔵の機能よりも枝の伸長成長に窒素が消費されたものと考察した。枝の全炭素量は、13Cの転流が確認された剥皮区のみ時系列に増加したが、残りの3処理区は果実の成熟初期に増加した後、成熟に伴い減少に転じた。葉の全炭素量は、低い水準で時系列に減少した。果実の全炭素量は、葉に比べると高い水準で時系列に減少した。枝、葉、果実で異なる炭素の利用、もしくは貯蔵の違いがあることが示唆される。これらのことから、亜熱帯の常緑亜高木のリュウキュウコクタンでは、並作年では果実生産のための繁殖資源の利用様式は、当年の光合成産物を消費し、一部には貯蔵された可溶性糖を利用していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口真吾
2. 発表標題 リュウキュウコクタン繁殖枝の摘葉処理が果実サイズの変化に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回九州森林学会大会研究発表会（鹿児島大学）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口真吾
2. 発表標題 リュウキュウコクタンの剥皮と摘葉が繁殖枝の炭素量、窒素量に及ぼす影響
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会発表（名古屋大学）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口真吾・上原文・松本一穂
2. 発表標題 リュウキュウコクタン繁殖枝の剥皮が光合成産物の転流、糖蓄積に及ぼす影響
3. 学会等名 第130回 日本森林学会大会（新潟朱鷺メッセ）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小西 照子 (Konishi Teruko) (30433098)	琉球大学・農学部・准教授 (18001)	植物生理学、糖鎖科学 博士（農学） 糖分析の実施指導を受けた。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------